

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN CÁNCER
ENDOMETRIAL TIPO I, PREDICTIVO DE COMPORTAMIENTO
TUMORAL**

POR

DRA. GABRIELA SOFÍA GÓMEZ MACÍAS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

JUNIO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN CÁNCER
ENDOMETRIAL TIPO I, PREDICTIVO DE
COMPORTAMIENTO TUMORAL**

Por

Dra. Gabriela Sofía Gómez Macías

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

JUNIO, 2017

“PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN CÁNCER ENDOMETRIAL TIPO I, PREDICTIVO DE COMPORTAMIENTO TUMORAL”

Aprobación de la tesis:

Dr. med. Oralia Barboza Quintana
Director de la tesis

Dr. med. Raquel Garza Guajardo
Miembro

Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez.
Miembro

Dr. C. Hugo Barrera Saldaña
Miembro

Dr. med. Jesús Ancer Rodríguez
Miembro

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

a la Dr. Med. **Oralia Barboza Quintana**, por todo su apoyo para la realización de este proyecto, y no solo en este paso, si no también en mi formación como medico patólogo y como persona, ya que es una mujer incansable y admirable por su trayectoria profesional.

a la Dr. Med. **Raquel Garza Guajardo**, por su colaboración para la realización de este proyecto, y por todas sus enseñanzas y apoyo en mi formación como medico especialista.

a la Dra. C. **María de Lourdes Garza Rodríguez**, por su apoyo en el área de laboratorio y de revisión de este proyecto.

al Dr. C. **Hugo Barrera Saldaña**, por su asesoría y revisión y consejos para llevar a cabo este proyecto.

al **Dr. Med. Jesús Ancer Rodríguez**, que con su gran trayectoria ha abierto de una u otra forma la puerta para que muchos de nosotros realicemos logros que nos propongamos.

a todo el **personal del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario de la UANL**, que con su profesionalismo, respeto y calidez humana hacen día a día que el trabajo se lleve a cabo de forma amena, los cuales hicieron posible la realización de este proyecto de alguna manera.

Agradezco a la **Universidad Autónoma de Nuevo León** por abrirme las puertas para mi formación profesional y desarrollarme en el ámbito laboral, motivo del cuál me siento muy orgullosa.

DEDICATORIAS

a mi madre **Silvia**, quien es mi amiga y mi apoyo moral, quien con sus consejos hace que día a día trate de ser una mejor persona, y que sus bendiciones se convierten en fortaleza.

a mi padre **Gildardo**, quien se ha puesto de ejemplo para saber que con trabajo y dedicación se puede llegar a cualquier meta.

a mi **familia**, que ha sido amor y apoyo incondicional en el transcurso de mi vida.

a mis **Amigos**, que enlistarlos sería interminable, ya que a donde quiera que voy tengo la fortuna de encontrar gente con la me siento como en familia, apoyada y querida, lo cual agradezco infinitamente a Dios.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I Página

1. RESÚMEN.	1
------------------	---

Capítulo II

2. INTRODUCCIÓN.	3
-----------------------	---

Capítulo III

3. ANTECEDENTES.	12
-----------------------	----

Capítulo IV

4. JUSTIFICACIÓN.	15
------------------------	----

Capítulo V

5. OBJETIVO GENERAL.	17
---------------------------	----

Capítulo VI

6. HIPÓTESIS.	18
--------------------	----

Capítulo VII

7. OBJETIVOS PARTICULARES.	19
---------------------------------	----

Capítulo VIII

8. MATERIALES Y MÉTODOS.	20
-------------------------------	----

Capítulo IX

9. RESULTADOS.	25
---------------------	----

Capítulo X

10. DISCUSIÓN.	47
---------------------	----

Capítulo XI

11. CONSCLUSIONES.	52
-------------------------	----

Capítulo XII

12. REFERENCIAS.	53
-----------------------	----

Capítulo XIII

13. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.	60
----------------------------------	----

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tipos de Carcinoma de Endometrio.....	4
2. Factores de riesgo para Carcinoma de Endometrio.....	5
3. Estadío Clínico-Patológico del Carcinoma de Endometrio.....	7
4. Biomarcadores en cáncer de endometrio y su función.....	16
5. Parámetros Clínico-Patológicos.....	26
6. Parámetros clínico-patológicos y expresión de RE.....	28
7. Parámetros clínico-patológicos y expresión de RP.....	29
8. Parámetros clínico-patológicos y expresión de Ki67.....	30
9. Parámetros clínico-patológicos y expresión del gen MMP11.....	35
10. Parámetros clínico-patológicos y expresión del gen ESR1.....	38
11. Parámetros clínico-patológicos y expresión del gen PTEN.....	41
12. Parámetros clínico-patológicos y expresión del gen PIK3CA.....	43
13. Parámetros clínico-patológicos y expresión del gen MKI67.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Grados Histológicos del Carcinoma de Endometrio de tipo 1.....	6
2. Carcinogénesis endometrial.....	9
3. Carcinoma de endometrio bien diferenciado e IHQ.....	31
4. Carcinoma de endometrio moderadamente diferenciado e IHQ...	32
5. Carcinoma de endometrio poco diferenciado e IHQ.....	33
6. Niveles de expresión del Gen MPP11.....	34
7. Niveles de expresión del gen ESR1.....	37
8. Niveles de expresión del gen PTEN.....	40
9. Niveles de expresión del gen PIK3CA.....	43
10. Niveles de expresión del gen MKI67.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

CAP: Colegio Americano de Patólogos.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RE: Receptores de Estrógeno

RP: Receptores de Progesterona

IHQ: Inmunohistoquímica

MMP: Metaloproteinasas

CAPÍTULO I

RESUMEN

Antecedentes: La expresión génica es una medida de la actividad de un gen. Actualmente una publicación realizó una integración genómica, proteínica y de transcripción de 373 carcinomas de endometrio.

Objetivo: Describir el perfil de expresión de 5 genes relacionados a dependencia hormonal, índice de proliferación celular, invasión y progresión, buscando correlacionarlos con el estadio patológico, respuesta a tratamiento y recurrencia en carcinoma de endometrio tipo I.

Materiales y métodos: Se incluyeron 140 casos de carcinoma endometrial de tipo I, datos clínicos-patológicos. Se realizaron tinciones inmunohistoquímica para receptores de estrógenos, progesterona, Ki67, D240 y CD31. Se midió la expresión de *MMP11*, *ESR1*, *PTEN*, *PIK3CA* Y *MKI67* en tejidos endometriales, mediante RT-PCR.

Resultados: Los casos con sobreexpresión de *MMP11*, *ESR1*, *PTEN* y *PIK3CA* se correlacionaron con parámetros clínico-patológicos de buen pronóstico, la expresión de *MKI67* se correlacionó con los resultados de proteína por inmunohistoquímica.

Conclusiones: El perfil de expresión genética de los cinco genes en este estudio (*MMP11*, *ESR1*, *PTEN*, *PIK3CA*, y *MKI67*), correlaciona con lo reportado en la literatura de forma aislada, estos genes pudieran ser usados mediante una plataforma moléculas para predecir el comportamiento de las pacientes con carcinoma de endometrio tipo 1.

ABSTRACT

Background: Gene expression is a measure of the activity of a gene. There is a publication where genomic integration, proteomic and transcription characterization of 373 endometrial carcinomas were performed.

Objective: To describe the expression profile of 5 genes related to hormone dependence, cell proliferation index, invasion and progression, correlated them with the pathological stage, response to treatment and recurrence in endometrial carcinoma type I.

Methods: We included 140 cases of endometrial carcinoma type I, clinical-pathological data. Immunohistochemical staining was performed for estrogen, progesterone receptors, Ki67, D240 and CD31. The expression of *MMP11*, *ESR1*, *PTEN*, *PIK3CA* and *MKI67* genes was determined in endometrial carcinomas tissues by RT-PCR.

Results: *MMP11*, *ESR1*, *PTEN* and *PIK3CA* subexpression cases were correlated with clinical-pathological parameters of well prognosis, *MKI67* was correlated with protein expression results by immunohistochemistry.

Conclusions: The genetic expression profile of the five genes in this study (*MMP11*, *ESR1*, *PTEN*, *PIK3CA*, and *MKI67*), correlates with that reported in the literature, these genes could be used using a platform molecules to predict the behavior of patients with endometrial carcinoma type 1.

CAPÍTULO II

INTRODUCCION.

Existen dos grupos de pacientes en riesgo para carcinoma de endometrio según estudios demográficos e histopatológicos, el primero es el carcinoma endometrioide y sus variantes el cual es frecuentemente denominado tipo I, dicho grupo representa el 90% del cáncer de endometrio, y es debido a una estimulación crónica a estrógenos, este tipo de carcinomas tienden a ser bien diferenciados y a imitar histológicamente a las glándulas endometriales normales (de ahí el termino de endometrioide), y tienden a ser asociados con buen pronóstico. El segundo grupo y menos común es el carcinoma endometrial tipo II, el cual no ha sido asociado con hiperestrogenismo, y se caracterizan por tener diferentes patrones histológicas pobremente diferenciados que incluyen al carcinoma de células claras y al seroso papilar, además se asocia a un peor pronóstico en comparación con el tipo endometrioide o tipo I¹⁻³. Ambos tipos tienen diferentes caminos moleculares para su génesis, y sus características generales son representadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de Carcinoma de Endometrio.

PARAMETROS	TIPO 1	TIPO 2
Frecuencia	70-80%	20%
Asociación a estrógenos	Sí	No
Edad	50-60	60-70
Precursor	Hiperplasia endometrial	Desconocido
Tipos	Endometriode	Seroso papilar y Células Claras
Daño genético	Mutación de PTEN, MSI, entre otros.	Mutación de P ₅₃ , Deleciones 1p, pérdida del PAX2
Asociación a síndromes hereditarios	Síndrome de Lynch II	Ninguna
Diseminación	Ganglios linfáticos	Peritoneo
Pronóstico	Favorable	Pobre

El cáncer de endometrio ocupa el 6to lugar de incidencia a nivel mundial. Se estiman 40,000 casos nuevos por año, con aproximadamente 7,500 muertes, con edad media de aparición a los 61 años. Es uno de los carcinomas ginecológicos más frecuentes en Estados Unidos (68% enfermedad localizada, 20% regional, 8% metastasico). En México la incidencia es de 1,731 casos (2do en frecuencia del tracto ginecológico). Usualmente ocurre en las mujeres postmenopáusicas con un pico de incidencia entre los 55-65 años, con una media de 63 años⁴. Los factores de riesgo son enlistados en la Tabla 2.

Tabla 2. Factores de Riesgo para Carcinoma de Endometrio.

Factores demográficos

• Edad mayor 45ª	RR 4–8
• Raza Blanca	RR 2
• Nivel socioeconómico alto	RR 1.3
• Historia familiar de cáncer endometrial	RR 2
• Europea/EUA	RR 2–3

Factores Hormonales / reproductivos

Estimulación Estrogénica Crónica:

• Remplazo hormonal (estrógenos)	RR 2–12
• Obesidad	RR 10
• Menarca temprana/ Menopausia tardía	RR 8
• Nuliparidad	
• Anovulación	RR 2–3
• Tumor Productor de estrógenos	

Factores Biológicos

• Hiperplasia Endometrial	RR 2 – 15
• Diabetes Mellitus	RR 3
• Enfermedad de vesícula biliar	RR 3.7
• Hipertensión	RR 1.5
• Radioterapia pélvica previa	RR 8
• Tamoxifeno	RR 3–7

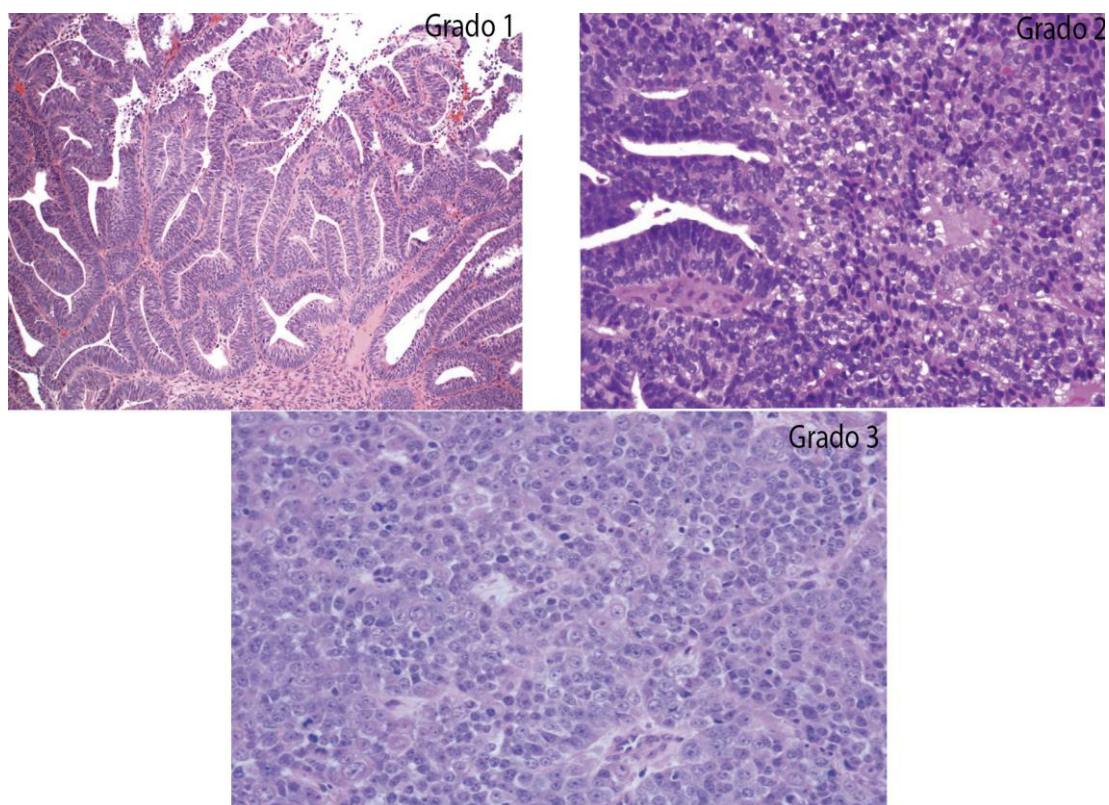
El sangrado uterino anormal o el sangrado posmenopáusico es el signo de presentación más frecuente. El aumento de la edad en el momento del sangrado posmenopáusico se asocia con una mayor incidencia de carcinoma. El riesgo de cáncer de endometrio puede ser tan alto como 40% a 10 años posterior a menopausia, con presencia de factores de riesgo asociados ⁴.

El grado tumoral esta basado en la clasificación de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia). Se basa en el porcentaje de componentes glandulares sólidos:

- Grado 1: crecimiento sólido inferior al 5%
- Grado 2: 5% a 50% de crecimiento sólido
- Grado 3: más de 50% de crecimiento sólido

La atipia nuclear puede aumentar el grado FIGO basado en las áreas solidas del tumor ⁵. Figura 1.

Figura 1. Grados Histológicos del Carcinoma de Endometrio de tipo 1.



El principal factor pronóstico es el estadio clínico-patológico al momento de su presentación. Tabla 3. No hay tratamiento adicional para la Etapa IA, grado 1 o 2, ya que las pacientes son curadas con histerectomía. La radiación vaginal, queda establecida para la Etapa IB, grado 1 ó 2 y Etapa IA, grado 3. La quimioterapia +/- radiación dirigida para las Etapas III y IV. Etapa IC, grado 3. Los carcinomas de estadio I, grado I o II se asocian con tasas de curación de ~ 90% o más. Los tumores de alto grado, y alto estadio, especialmente las variantes indiferenciadas o polimórficas, tienen un pronóstico desalentador (estadio III 20% a 30% supervivencia a 5 años, estadio IV ~ 0% supervivencia a 5 años). Los tumores que excedan el 50% de invasión miometrial determinada intraoperatoriamente suelen recibir disección de ganglios linfáticos en los Estados Unidos ⁶.

Tabla 3. Estadio Clínico-Patológico del Carcinoma de Endometrio.

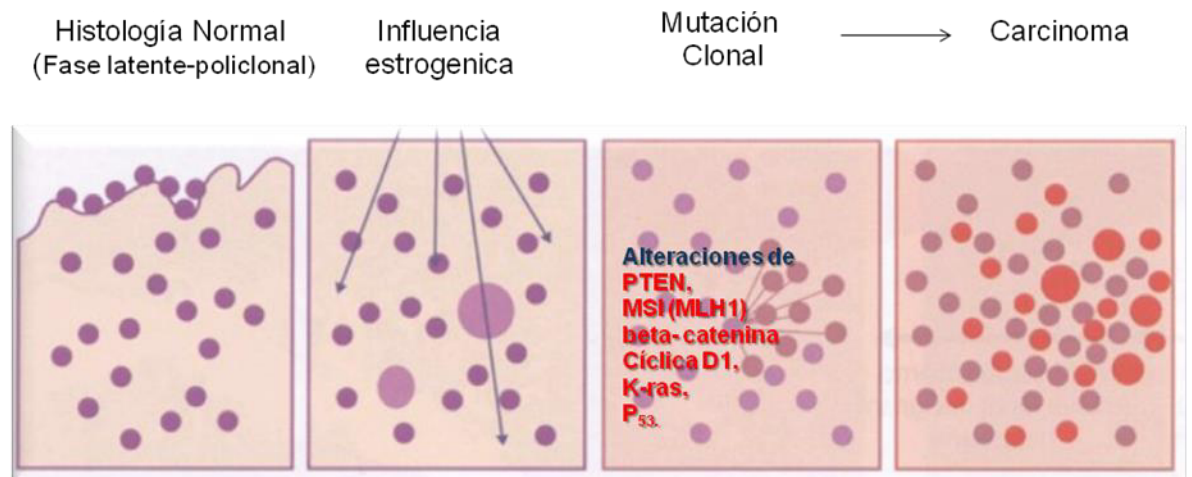
Tumor primario (pT)	
pTX	Tumor primario que no pudo ser evaluado
pT0	Sin evidencia de tumor primario
pT1a	Tumor limitado al endometrio o que infiltra menos de la mitad del miometrio.
pT1b	Tumor que infiltra más de la mitad del miometrio.
pT2	Tumor que invade el tejido conectivo estromal del cérvix.
pT3a	Tumor presente en la serosa y/ anexos (extensión directa o mts)
pT3b	Tumor presente en vagina o parametrios (extensión directa o mts)
pT4	Tumor que invade la mucosa de vejiga y/o intestino.
Ganglios linfáticos regionales (pN)	
NX	No pueden ser evaluados
N0	Sin metástasis a ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis a ganglios linfáticos pélvicos
N2	Metástasis a ganglios linfáticos paraaórticos (con o sin involucro de GP)

CARCINOGENESIS ENDOMETRIAL.

En casi la mitad de las mujeres aparentemente normales, tienen pequeñas fracciones de glándulas endometriales mutadas (del gene supresor del PTEN) en un endometrio proliferativo histológicamente sin alteraciones, constituyendo esto una fase latente que puede progresar a neoplasia. Esta fase latente quizá persista por años con una presencia continua de glándulas mutadas dispersas y entremezcladas después de muchos ciclos menstruales, estas glándulas son probablemente representadas por la población de células de reserva que regeneran nuevamente funcionales cada mes. Los factores endocrinos actúan sobre esta fase latente precancerosa para modular la involución o progresión a una neoplasia. Además la transición hacia el carcinoma requiere acumulación de daño genético por lo menos en una de las célula en fase latente, la cual prolifera clonalmente para formar un continuo grupo de glándulas alteradas histológicamente reconocidas, pudiendo formar una neoplasia intraepitelial endometrial, la cual tiene solo un potencial de crecimiento levemente incrementado, teniendo susceptibilidad para moduladores de crecimiento por factores hormonales, algunas pueden involucionar, otras a través de mutaciones adicionales buscan un estado donde el soporte hormonal prolongado no sea un requisito para la sobrevivencia. La transformación maligna hacia cáncer es entonces definida por la acumulación de suficientes trastornos genéticos para permitir la invasión al tejido estromal adyacente^{8,9}

Figura. 2.

Figura. 2 Carcinogénesis endometrial.



Dentro de los trastornos genéticos que se presentan en la carcinogénesis endometrial el mas frecuente es la inactivación del PTEN, el cual es un gen supresor tumoral que inhibe la proliferación celular a través de la regulación de señales intracelulares, el cual se ha encontrado mutado en el 80% de los carcinomas endometriales (tipo 1, asociado a estrógenos). La perdida de función del PTEN por mutación es un evento temprano en la tumorigenesis endometrial que quizá ocurra en respuesta a factores de riesgo endocrinos conocidos ^{10,11}. Dentro de otros oncogenes mutados con menor frecuencia se encuentra el K-ras cuya alteración ocurre en estadios tempranos de la progresión neoplásica del endometrio, ya que presente en porcentajes similares en las hiperplasias sin importar el tipo (16%) y en el carcinoma (30%) ¹². La ciclina D1 es un protooncogen importante que regula la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, que también se ha encontrado alterado en la carcinogénesis endometrial expresándose en el 7.1% de los pacientes con hiperplasia atípica y en 26.6% de los carcinomas endometriales ¹³. El P53 es el gen supresor tumoral más mutado en los

cánceres humanos, que regula la apoptosis y el ciclo celular, y cuya alteración permite que las células anormales proliferen dando por resultado un carcinoma, la mutación de este gen se encuentra asociada principalmente al carcinoma endometrial tipo II (no relacionado a estrógenos), y en un menor porcentaje al carcinoma endometrial tipo I (asociado a estrógenos) encontrándose expresión en el 5-30% del carcinoma tipo I y en el 14% de las hiperplasias con atipia¹⁴, encontrándose expresado en su mayoría en los carcinomas de alto grado¹⁵.

La Beta-catenina es una subunidad de las proteínas de unión llamadas caderinas, que además de su función de este complejo de adhesión celular, sirve como elemento clave en la transducción de señales vía Wnt, cuya alteración ha sido implicada en la carcinogénesis endometrial, encontrándose mutada en un 20-30% de los carcinomas y en un 12.5% de las hiperplasias atípicas, jugando un rol importante en el evento secuencial hiperplasia-carcinoma^{16,17}.

El 98% de los adenocarcinomas endometriales ocurren como una enfermedad esporádica y raramente son manifestación de un síndrome de cáncer hereditario, que también incluyen a carcinomas de ovario y colon. Siendo el carcinoma endometrial el más común asociado con síndrome de cáncer colonico no poliposico (síndrome de Lynch II) atribuidos a defectos en los genes reparadores del ADN como es el MLH1¹⁸.

Aunque también se ha encontrado un alta incidencia de inestabilidad micro satelital por inactivación del gen MLH1 (20-38%) en los cánceres endometriales no familiares, incluso se ha encontrado en la hiperplasia en un 41% ya sea con o sin atipia, lo cual indica que la alteración del MLH1 ocurre en eventos tempranos de la carcinogénesis endometrial ¹⁹.

CAPÍTULO III

ANTECEDENTES

EXPRESIÓN GENÉTICA.

La expresión génica es una medida de la actividad de un gen, la cual se determina por el número de veces que se transcribe en ARNm y finalmente se traduce la proteína que codifica. Los patrones de variación o expresión de los genes asociados con pronósticos, las respuestas a diferentes tratamientos o fenotipos, se llaman "perfiles de genes" o "firmas genéticas"^{20,21}. Los cuatro principales plataformas de prueba utilizadas para la detección de perfiles genéticos son:

- Inmunohistoquímica (IHC).
- Hibridación in situ fluorescente (FISH).
- Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa (PCR-TR).
- Microarreglos de ADN (detección cuantitativa de ADNc).

La primera neoplasia para la que se desarrolla perfiles de expresión genética ("firma genética") ha sido el carcinoma de glándula mamaria, con tres pruebas actualmente disponibles en el mercado: Oncotype, MamaPrint y

PAM 50. Estas pruebas comprenden la expresión de múltiples genes que predicen los probables beneficios de la quimioterapia, así como la probable recurrencia y sobrevida dentro de los 10 primeros años posterior al diagnóstico. Las tres pruebas son biomarcadores pronósticos con los cuales se estima el riesgo de recurrencia, y aparentemente provee información pronóstica de los factores estándares clínico patológicos, como son metástasis tamaño tumoral, grado y tipo histológico, estado de receptores hormonales^{22, 23}.

BIOMARCADORES DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO.

Se han postulado biomarcadores pronósticos para el carcinoma de endometrio, entre los que destacan²⁴⁻²⁶:

- La proteína Ki-67 que mide el índice de proliferación celular.
- Los receptores hormonales (estrógenos y progesterona).
- La expresión de p53.
- Marcadores asociados a la reparación del ADN.

Existe una publicación actual en donde se realizó una integración genómica, caracterización proteínica y de transcripción de 373 carcinomas endometrioides por la técnica de secuenciación, que incluyó los dos grandes grupos de carcinoma de endometrio, el tipo I, II y variedades mixtas; encontrándose que los carcinomas tipo II (serosos) frecuente mutación de p53, bajos niveles de receptores de estrógenos y progesterona, y pocos cambios en la metilación ADN. En la mayoría de los tumores

endometrioides tipo I tuvieron pocas alteraciones en el P53, pero frecuentes mutaciones en *PTEN*, *CTNNB1*, *PIK3CA*, *ARID1A*, Y *KRAS*, y nuevas mutaciones en la cromatina SWI/SNF del complejo remodelador del gen *ARID5B*. En un subconjunto de tumores endometrioides se encontró una mutación frecuente en *POLE*. Con los resultados anteriormente mencionados el carcinoma endometrioide fue clasificado por el autor de este estudio en 4 subgrupos: ultramutación de *POLE*, hipermutación de la inestabilidad microsatelital, número de copias altas y bajas. El carcinoma endometrial de tipo seroso compartió características genómicas con el carcinoma seroso de ovario y el carcinoma mamario parecido al basal. Proponiendo que con estos resultados los carcinomas de endometrio pueden ser reclasificados genéticamente, y quizá afecte al tratamiento adyuvante de pacientes con tumores agresivos ²⁷.

CAPÍTULO IV.

JUSTIFICACIÓN

En una búsqueda intencionada no se encontró evidencia de algún estudio dirigido sólo a carcinoma de endometrio tipo I, que haya medido la expresión de genes asociados a receptores hormonales, índice de proliferación celular, invasión y progresión, que pueden ser correlacionados con el estadio patológico, respuesta a tratamiento y recurrencia. En este estudio se incluyeron 6 genes. (5 genes problema y un gen control). Su selección se basó en que existe una mutación conocida en el carcinoma endometrial tipo I. Son fundamentales para realizar los pasos moleculares de replicación no controlada de las células tumorales, invasión, permeación vascular y metástasis. Los biomarcadores propuestos para este estudio son: *MKi67* (proliferación celular), *MMP11* (invasión), *ESR1* (receptores hormonales), *PTEN* y *PIK3CA* (carcinogénesis). Tabla 4.

Tabla 4. Biomarcadores en cáncer de endometrio y su función.

GEN	DEFINICIÓN	FUNCIÓN
1.- Ki67	Codifica una proteína que participa en la proliferación celular.	Se ha demostrado una asociación de su alta expresión con peor pronóstico y pobre respuesta a TX
2.- MMP11	Codifica a las proteínas llamadas metaloproteasas.	Participa en la degradación de la membrana basal favoreciendo la invasión y metástasis tumoral.
3.- ESR1	Codifica a los RE α , los cuales son encontrados en células malignas de CA mamario y de endometrio.	Su mutación da como resultado un incremento en la división celular y replicación del ADN.
4.- PTEN	Gen supresor tumoral que regula negativamente la vía de señalización AKT/PKB. Gen más frecuentemente mutado en el CE tipo I (77.7%).	Participa en el inicio de múltiples procesos de la carcinogénesis de endometrio (mutaciones, deleciones e hipermetilación)
5.- PIK3CA	Familia de las quinasas, la proteína codificada por este gen representa la subunidad catalítica, que utiliza ATP para fosforilación oxidativa.	Responsables funciones celulares como proliferación, supervivencia y migración celular. Mutado en el 53.1 % CE.

CAPÍTULO V

OBJETIVO GENERAL

Describir el perfil de expresión de 5 genes relacionados a dependencia hormonal, índice de proliferación celular, invasión y progresión, buscando correlacionarlos con el estadio patológico, respuesta a tratamiento y recurrencia en carcinoma de endometrio tipo I.

CAPÍTULO VI

HIPÓTESIS

La sobreexpresión o la sub-expresión de 5 genes asociados a dependencia hormonal, índice de proliferación celular, invasión y progresión, está relacionada con cierto estadio patológico, respuesta a tratamiento y recurrencia en carcinoma de endometrio tipo I.

HIPÓTESIS NULA

La sobreexpresión o la sub-expresión de 5 genes asociados a dependencia hormonal, índice de proliferación celular, invasión y progresión, *no* está relacionada con cierto estadio patológico, respuesta a tratamiento y recurrencia en carcinoma de endometrio tipo I.

CAPÍTULO VII

OBJETIVOS PARTICULARES

Describir la expresión de genes relacionados con dependencia hormonal, índice de proliferación celular, invasión y progresión en cáncer de endometrio tipo I.

Relacionar el estadio patológico, la respuesta a tratamiento y recurrencia de pacientes con carcinoma de endometrio tipo I, con la expresión de genes relacionados a dependencia hormonal, índice de proliferación celular, invasión y progresión.

Paralelamente, buscar el índice de proliferación celular mediante inmunohistoquímica a base de la proteína ki67, receptores de estrógeno y progesterona, con la expresión de los genes respectivos.

CAPÍTULO VIII

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS Y ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Se incluyeron 140 casos de carcinoma endometrial de tipo I se obtuvieron de los archivos del Servicio de Patología del Hospital Universitario de la UANL, durante un período de 5 años (2009-2014); De estos, 51 casos tenían tejido endometrial adyacente al tumor, que se incluyó como control interno para el estudio. También se incluyeron 30 casos de control de endometrio proliferativo y secretor. Los casos de carcinoma endometrioide fueron revisados para verificar el tipo, grado histológico y estadio patológico, de acuerdo con el Colegio Americano de Patólogos (CAP) / Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). En cada caso, se obtuvieron e incluyeron datos patológicos clínicos.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- 1.- Casos que contaron con laminillas y bloques de parafina.
- 2.- Material suficiente en calidad y cantidad para la realización de estudios de IHQ y determinación de ARN.
- 3.- Casos que contaron con los datos clínicos indispensables para establecer respuesta a tratamiento y recurrencia.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1.- Casos que no cuentan con laminillas y bloques de parafina.
- 2.- Material insuficiente en calidad y cantidad para la realización de estudios de IHQ y determinación de ARN.
- 3.- Casos que no cuentan con los datos clínicos indispensables para establecer respuesta a tratamiento y recurrencia.
- 4.- Casos de revisión de otras instituciones que carezcan de bloques de parafina respectivos.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Las zonas tumorales más representativas se seleccionaron en cada caso para microarreglos de tejidos. Posteriormente se realizaron cortes de 3 μ . Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para receptores de estrógenos (ERa Clone 1D5 M7047 Dako), receptor de progesterona (Clone PgR 636, Dako), Ki67 (A047; Dako), D240 (Clone D2-40, Dako) y CD31 (Clone JC70A Dako) basándose en las recomendaciones del fabricante para cada anticuerpo. Se incluyeron controles positivos y negativos para cada marcador en cada laminilla. Se consideró positividad si más del 10% de las células tenían una positividad nuclear para receptores de estrógeno (ER) y receptores de progesterona (PR) y se consideró un índice proliferación alto si más del 5% de las células tenían una positividad nuclear para la tinción Ki67. La tinción con D240 y CD31 se utilizó para corroborar la invasión angio-linfática observada en histopatología.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN

Se realizaron disecciones macroscópicas de las áreas más representativas del tumor y se obtuvo el ARN total utilizando el kit All Prep DNA / RNA FFPE (Qiagen, Venlo, Limburg, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó y calificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 200 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, MA).

EXPRESIÓN GENÉTICA

Para detectar la expresión de *MKi67*, *MMP11*, *ESR1*, *PTEN* y *PIK3CA* en tejidos endometriales, las muestras se analizaron mediante RT-PCR. Para la cuantificación relativa, la RT se realizó utilizando la mezcla principal de cDNA SuperScript® VILO™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) en el Verity Thermal Cycler (Applied Biosystems Co., Carlsbad, CA) con 2 µg de ARN total con un primer paso para cDNA De síntesis durante 10 min a 25 ° C seguido por una etapa de inactivación enzimática de 5 min a 85 ° C.

El método de comparación del valor $\Delta\Delta C_t$ se usó para detectar el nivel de expresión génica con β -actina como referencia interna. Las reacciones de RT-PCR se realizaron usando Taqman Universal Master Mix 2X con UNG (Applied Biosystems Co.) en el sistema de PCR en tiempo real Step-One-Plus (Applied Biosystem, Co.) con 250 ng de cDNA y usando el protocolo estándar de amplificación Para las sondas TaqMan (40 ciclos de 15 segundos a 95 ° C con una extensión a 60 ° C durante 1 minuto). Para detectar la señal fluorescente se utilizó el Taqman Gene Expression Assay Hs00968295_m1 preprogramado para *MKi67*, *MMP11*, *ESR1*, *PTEN* y *PIK3CA*, Hs99999903_m1 para ACTB como control interno (los cebadores de secuencia pertenecen a Applied Biosystems Co.). Todas las RT-PCR se realizaron en repeticiones independientes y un valor superior a 1 se consideró sobreexpresión y por debajo de 1 sub-expresión, de acuerdo con el valor estándar en los controles de endometrio secretoras.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de la posible asociación entre los patrones de expresión de los genes (*MKI 67*, *MMP11*, *ESR1*, *PTEN* y *PIK3CA*), con las variables clínicas patológicas, como edad, grado histológico, estado patológico, invasión vascular, recurrencia y muerte, así como con expresión de receptores hormonales y Ki67, con la prueba de chi-cuadrada. Un valor de p menor que 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

CAPÍTULO IX

RESULTADOS

La edad media de los pacientes fue de 65 años con un rango de 25-82. El grado histológico de los carcinomas endometriales de tipo I más frecuente fue G2, es decir, moderadamente diferenciado (78.6%), seguido por G3, es decir, carcinomas poco diferenciados (17.3%) y G1, bien diferenciado (4.3%). La invasión angiolinfática estuvo presente en el 65,7% de los casos, y ausente en el 34.3%. Primeramente se determinó la presencia de invasión angiolinfática en los cortes de hematoxilina y eosina (H & E), y luego se corroboró con las tinciones de inmunohistoquímica a base de CD31 y D240, sin encontrarse falsos positivos o negativos. Con respecto a la etapa patológica, la mayoría de los casos se presentaron como una enfermedad localizada (estadio 1a y 1b) en un 79.3 %; ninguna paciente se presentó estadio IV. La disección ganglionar se realizó en el 55% de las pacientes, encontrándose en el 9% ganglios metástasis. En el 54% de los casos se realizó disección linfática pélvica en los pacientes y sólo el 8% presentó metástasis ganglionares. El 66.4% de las pacientes recibieron terapia adyuvante y la recurrencia se presentó en el 4.6, todas localizadas a nivel de cúpula vaginal, en los primeros 2 años después de la cirugía; cuatro pacientes murieron por enfermedad. Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros Clínico-Patológicos.

Parámetros clínico-patológicos		
Edad	Media	Rango
	56	29-85
Grado	Frecuencia	Porcentaje
G1	6	4.3 %
G2	110	78.6%
G3	24	17.1 %
Invasión vascular		
Presente	92	65.7 %
Ausente	48	34.3 %
Estadio pT		
pT1a	72	51.4 %
pT1b	39	27.9 %
pT2	11	7.9 %
pT3a	18	12.9 %
Disección ganglionar		
Realizada	77	55% , + (7) 9%
No realizada	63	45%
Terapia adyuvante	Frecuencia	Porcentaje
Recibida	93	66.4 %
No recibida	47	33.6 %
Recurrencia		
Presente	6	4.3 %
Ausente	134	95.7 %
Muerte	4	2.9 %

Los receptores de estrógeno resultaron positivos en el 82% de los casos, los receptores de progesterona en el 78.6%, y el Ki67 con índice de proliferación alta en el 57.1% de los casos. Por grado histológico los receptores de estrógeno presentaron mayor número de casos positivos en los carcinomas moderadamente diferenciados (G2), resultando estadísticamente significativo esta asociación (p 0.03). Las pacientes con mayor número de casos positivos para RE se encontraron en estadio patológico temprano (pT1a), en el 43.5%, así mismo los casos que presentaron positividad tuvieron ausencia de metástasis en su mayoría (76.6%), y solo se asocio con recurrencia en el 3.5% de los casos. Por lo anterior la expresión de receptores de estrógeno (RE), se asocia a parámetros de buen comportamiento. Tabla 6.

Tabla 6. Asociación a parámetros clínico-patológicos, con la expresión de RE por inmunohistoquímica.

Parámetros clínico-patológicos		Receptores de estrógeno		P
		Positivos	Negativos	
Grado Histológico	G1	5 (3.5%)	1 (0.7%)	0.03
	G2	95 (67.8%)	15 (10.7%)	
	G3	15 (10.7%)	9 (6.4%)	
Invasión vascular	Presente	75 (53.5%)	17 (12.1%)	1.00
	Ausente	40 (28.5%)	8 (5.7%)	
Estadio patológico	T1a	61 (43.5%)	11 (7.8%)	0.65
	T1b	32 (22.8%)	7 (5%)	
	T2	8 (5.1%)	3 (2%)	
	T3a	14 (10%)	4 (2.8%)	
Metástasis a GL	Presente	4 (5.1%)	3 (3.8%)	0.10
	Ausente	59 (76.6%)	11 (14.2%)	
Recurrencia	Presente	5 (3.5%)	1 (0.7%)	1.00
	Ausente	110 (78.5%)	24 (17.1%)	
Muerte	Presente	3 (2.1%)	1 (0.7%)	0.62
	Ausente	112 (80.1%)	24 (17%)	

Por su parte los receptores de progesterona (RP), al igual que los de estrógenos, fueron mayormente positivos en los casos moderadamente diferenciados (G2), 63.5%, y en aquellos en estadios tempranos (pT1a y 1b) en el 64.2%, con presencia de invasión vascular en el 48.5%, y metástasis a ganglios linfáticos en el 5.1%. La recurrencia se presentó tan solo en el 3.5% de las pacientes que expresaron receptores de progesterona. Lo anterior al igual que con la expresión de los receptores de estrógenos, correlaciona con factores asociados a buen pronóstico. Tabla 7.

Tabla 7. Asociación a parámetros clínico-patológicos, con la expresión de RP por inmunohistoquímica.

Parámetros clínico-patológicos		Receptores de progesterona		P
		Positivos	Negativos	
Grado Histológico	G1	6 (4.2%)	0	0.71
	G2	89 (63.5%)	21 (15%)	
	G3	15 (10.7%)	9 (6.4%)	
Invasión vascular	Presente	68 (48.5%)	24 (17.1%)	0.82
	Ausente	42 (30%)	6 (4.2%)	
Estadio patológico	T1a	61 (43.5%)	11 (7.8%)	0.22
	T1b	29 (20.7%)	10 (7.1%)	
	T2	7 (5%)	4 (2.8%)	
	T3a	13 (9.2%)	5 (3.5%)	
Metástasis a GL	Presente	4 (5.1%)	3 (3.8%)	0.15
	Ausente	57 (74%)	13 (16.8%)	
Recurrencia	Presente	5 (3.5%)	1 (0.7%)	1.00
	Ausente	105 (75%)	29 (20.7%)	
Muerte	Presente	4 (2.8%)	0	0.66
	Ausente	106 (75.7%)	30 (21.4%)	

La expresión de Ki 67 por inmunohistoquímica resulto estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al compararlo con el grado nuclear. La expresión de Ki67 estuvo presente en la mayoría de los casos con presencia de invasión vascular 40%, con presencia de metástasis a ganglios linfáticos en el 6.4%, los estadios patológicos fueron tempranos 44.9%, y la recurrencia asociada a la expresión de ki67 fue en el 2.1%. Tabla 8.

Tabla 8. Asociación a parámetros clínico-patológicos, con la expresión de Ki67 por inmunohistoquímica.

Parámetros clínico-patológicos		Ki 67		P
		Positivos	Negativos	
Grado Histológico	G1	1 (0.71%)	5 (3.5%)	0.05
	G2	62 (44.2%)	48 (34.2%)	
	G3	17 (12.1%)	7 (5%)	
Invasión vascular	Presente	56 (40%)	36 (25.7%)	0.28
	Ausente	24 (17.1%)	24 (17.1%)	
Estadio patológico	T1a	38 (27.1%)	34 (24.2%)	0.67
	T1b	25 (17.8%)	14 (10%)	
	T2	7 (5%)	4 (2.8%)	
	T3a	10 (7.4%)	8 (5.7%)	
Metástasis a GL	Presente	5 (6.4%)	2 (2.5%)	0.69
	Ausente	39 (50.6%)	31 (40.2%)	
Recurrencia	Presente	3 (2.1%)	3 (2.1%)	1.00
	Ausente	77 (55%)	57 (40.7%)	
Muerte	Presente	2 (1.4%)	2 (1.4%)	1.00
	Ausente	78 (55.7%)	58(41.4%)	

Figura 3. Imagen histológica de carcinoma de endometrio bien diferenciado (G1) y la expresión las tinciones de inmunohistoquímica a base de RE, RP, Ki67, CD31 Y D240.

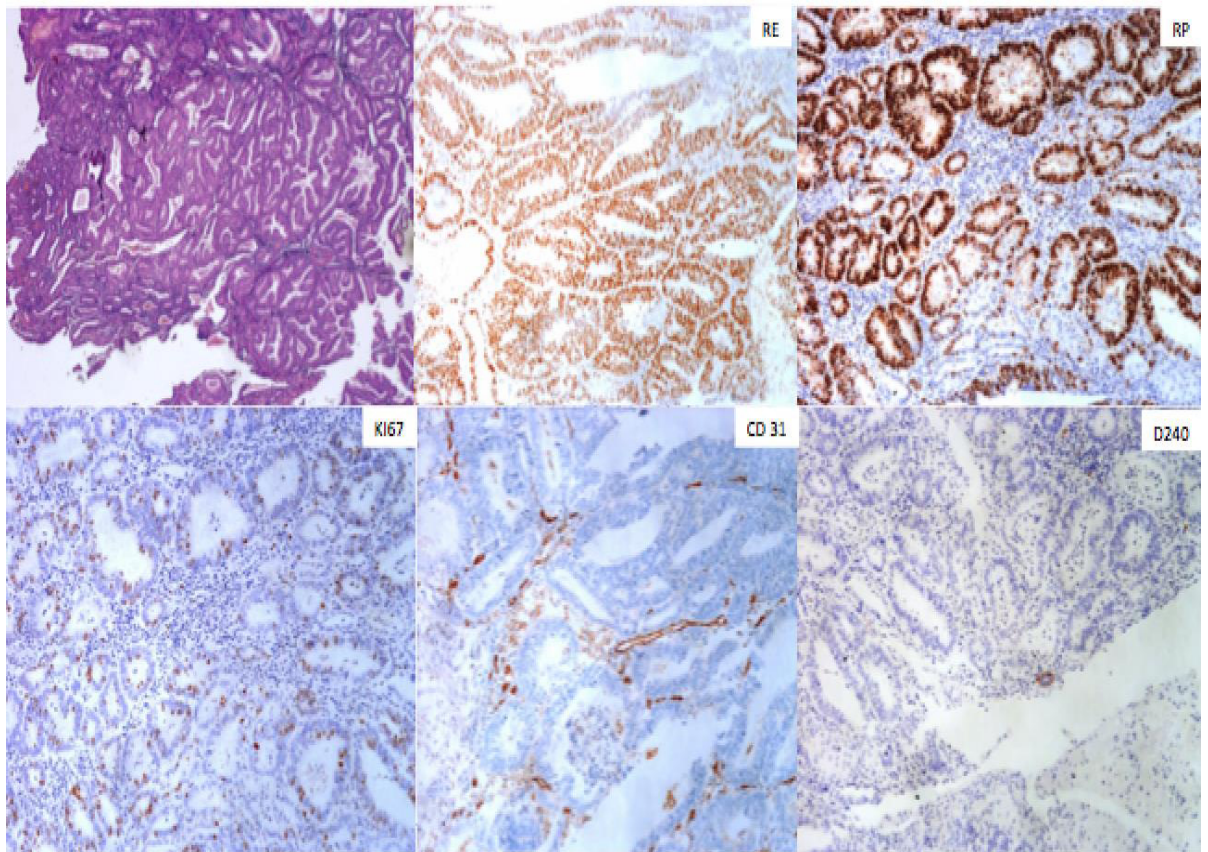


Figura 4. Imagen histológica de carcinoma de endometrio moderadamente diferenciado (G2) y la expresión las tinciones de inmunohistoquímica a base de RE, RP, Ki67, CD31 Y D240.

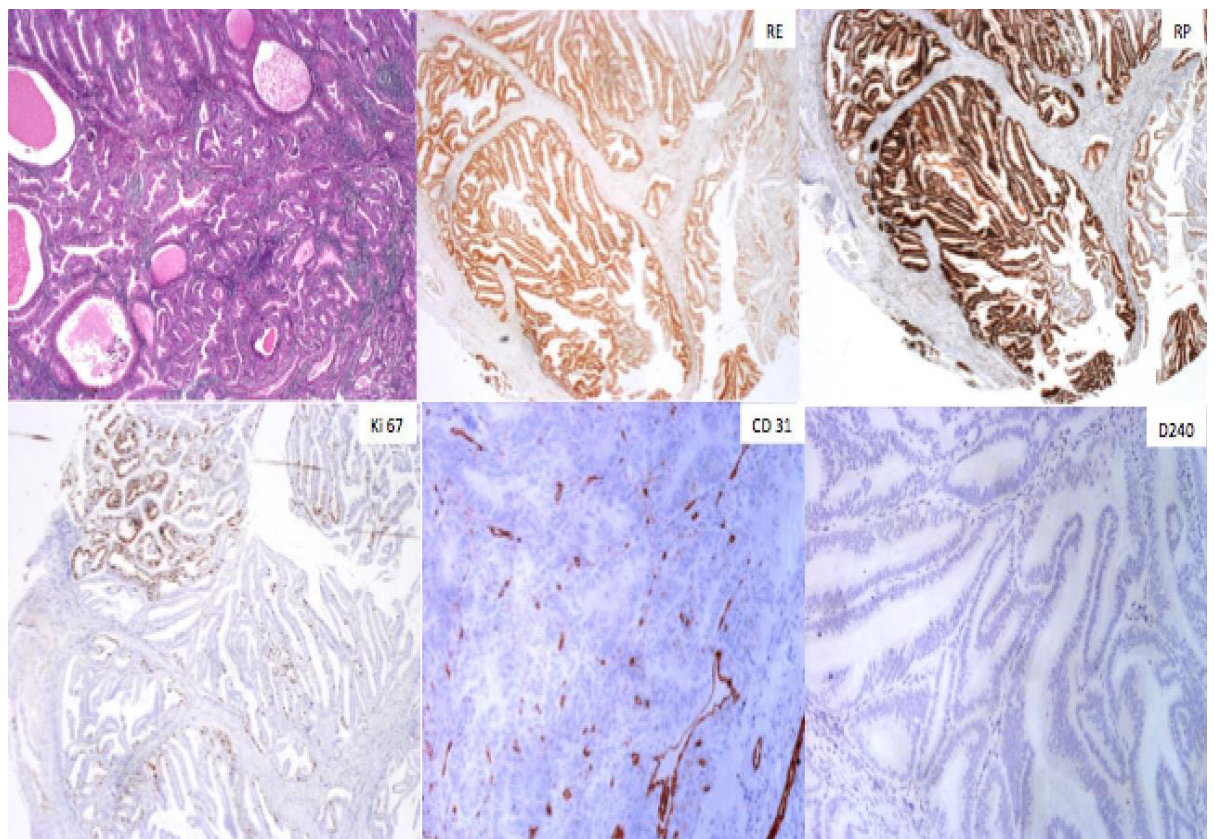
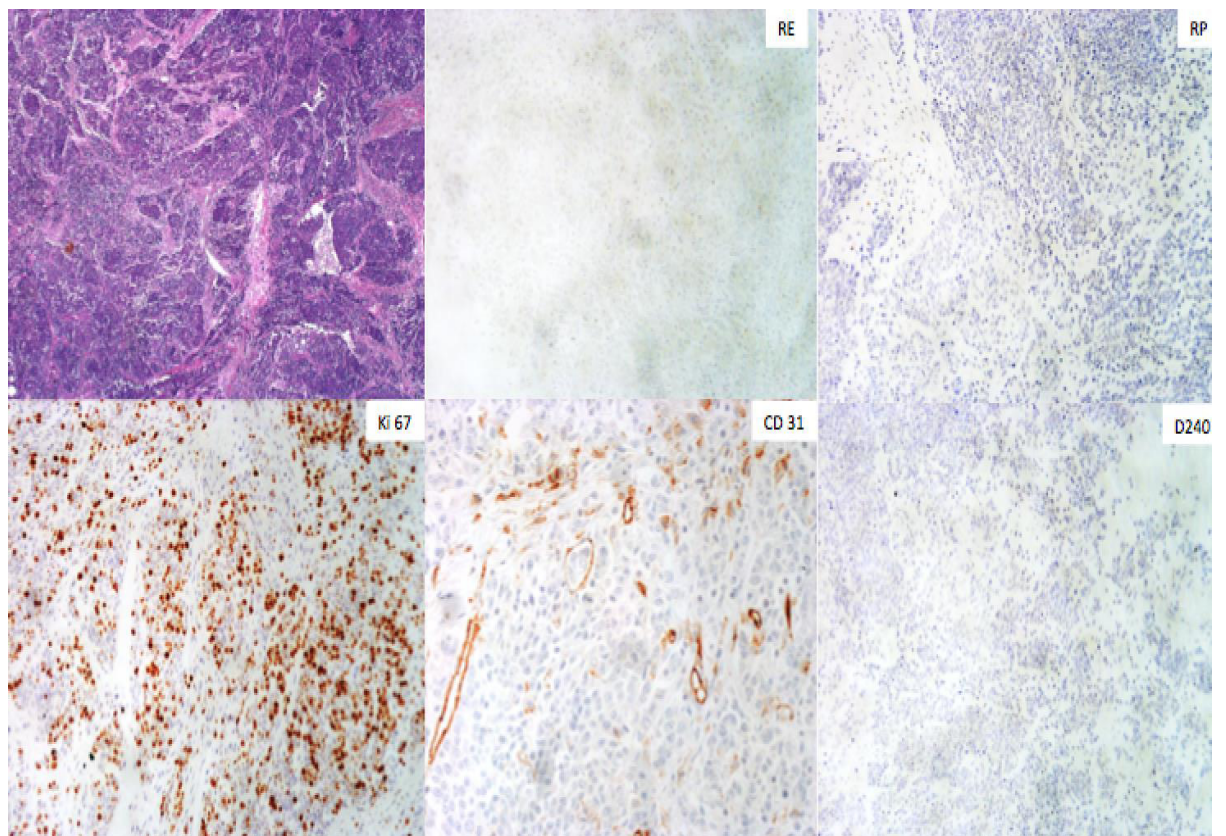


Figura 5. Imagen histológica de carcinoma de endometrio poco diferenciado (G3) y la expresión las tinciones de inmunohistoquímica a base de RE, RP, Ki67, CD31 Y D240.



GEN *MMP11*.

La sobreexpresión para el gen *MMP11*, fue en el 83.7% de los casos, de los cuales en el 16.3% fue mayor a 100 veces, con un rango de 1.1 a 600 veces, considerandose como sobreexpresión arriba de 1 y debajo de este valor subexpresión la cuál se presento en el 16.3%. Figura 6. De los casos con sobreexpresión el 50% se presentó en un estadio pT2 y el el 50% con invasión angiolinfática, solo un caso presento metástasis a ganglios linfáticos pélvicos. Todos los casos fueron moderadamente diferenciados (G2), excepto uno que resulto poco diferenciado (G3). Lo anterior sugiere que la sobreexpresión del gen *MMP11* esta relacionado a factores de buen pronostico. Tabla 9.

Figura 6. Niveles de expresión del Gen *MPP11*.

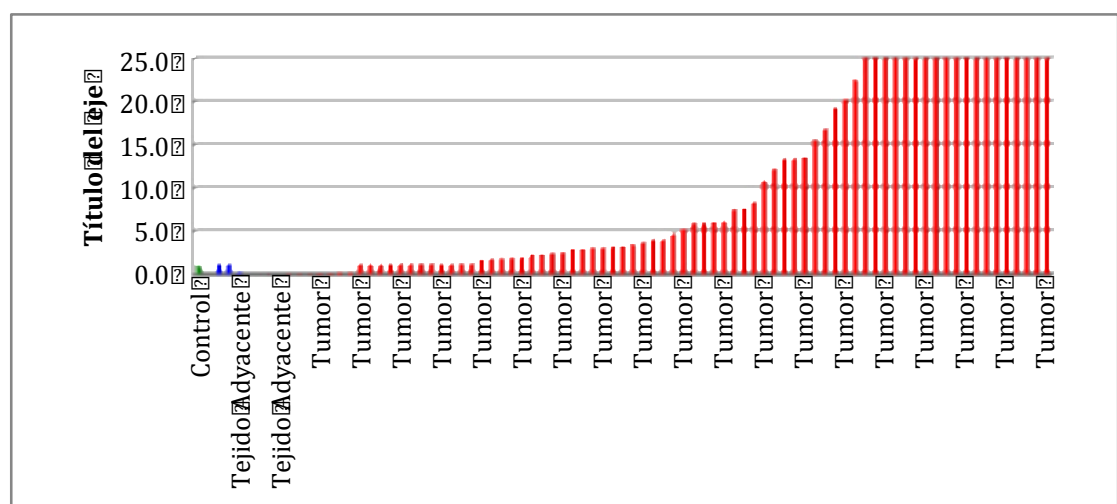


Tabla 9. Asociación a parámetros clínico-patológicos, con la expresión del gen *MMP11*.

Parámetros clínico-patológicos		GEN MMP11		P
		Sobreexpresión	Subexpresión	
Grado Histológico	G1	2 (4.0%)	0	0.71
	G2	34 (69.3%)	6 (12.2%)	
	G3	5 (10.2%)	2 (4%)	
Invasión vascular	Presente	26 (53%)	7 (14.2%)	0.24
	Ausente	15(30.6%)	1 (2.0%)	
Estadio patológico	T1a	24 (48.9%)	3 (6.1%)	0.27
	T1b	11 (22.4%)	3 (6.1%)	
	T2	3 (6.1%)	0	
	T3a	3 (6.1%)	2 (4%)	
Metástasis a GL	Presente	1 (3.7%)	1 (3.7%)	0.34
	Ausente	21 (77.7%)	4 (14.8%)	
Recurrencia	Presente	2 (4%)	1 (2.0%)	0.42
	Ausente	39 (79.5%)	7 (14.2%)	
Muerte	Presente	2 (4%)	0	1.00
	Ausente	39 (79.5%)	8 (16.3%)	

GEN *ESR1*

Para valorar su expresión se tomo como referencia el endometrio secretor con un valor mayor 1 para sobreexpresión y menor a este para subexpresión. La mayoría de los tejidos adyacentes mostraron sobreexpresión para gen de receptores de estrógeno, como es de esperarse. El 36.3% de los casos con sobreexpresión fue mayor a 4 veces que los controles. Figura 7. Estos casos se encontraron en un estadio pT1a, el 40% presento invasión angiolinfática, ningún caso con sobreexpresión del gen fue poco diferenciado, siendo el 62.5% moderadamente diferenciado (G2) y el 37.5% carcinomas bien diferenciados (G1). Resultadno estadísticamente significativo con la edad (p 0.02) .Tabla 10.

En cuanto a la correlación del gen *ESR1* con los receptores de estrógeno (RE) por inmunohistoquímica, el 68 % de los casos positivos para RE tuvieron sobreexpresión del gen. El 32 % de los casos positivos para RE tuvieron subexpresión del gen. Los casos con sobreexpresión del gen *ESR1* y con positividad para los RE por inmunohistoquímica, estan correlacionados a parametros clínico-patologicos de buen pronostico, como de era de esprarse de acuerdo a lo publicado en la literatura.

Figura 7. Niveles de expresión del gen *ESR1*.

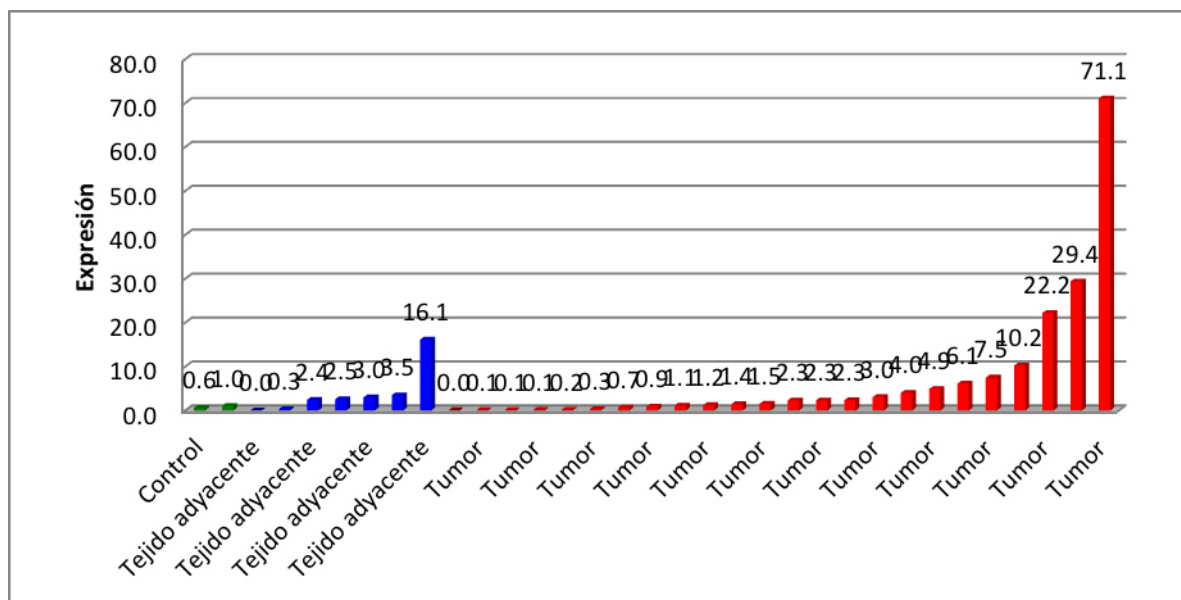


Tabla 10. Asociación a parámetros clínico-patológicos, con la expresión del gen *ESR1*.

Parámetros clínico-patológicos		GEN ESR1		P
		Sobreexpresión	Subexpresión	
Edad	>55 años	8 (36.3%)	0	0.02
	<55 años	7 (31.8%)	7 (31.8%)	
Grado Histológico	G1	3 (13.6%)	0	0.61
	G2	10 (45.4%)	6 (27.2%)	
	G3	1 (4.5%)	2 (9%)	
Invasión vascular	Presente	12 (54.5%)	6 (27.2%)	1.0
	Ausente	3 (13.6%)	1 (4.5%)	
Estadio patológico	T1a	8 (36.3%)	2 (9%)	0.16
	T1b	6 (27.2%)	3 (13.6%)	
	T2	1 (4.5%)	0	
	T3a	0	2 (4%)	
Metástasis a GL	Presente	2 (18.1%)	0	1.0
	Ausente	6 (54.5%)	3 (27.2%)	
Recurrencia	Presente	1 (4.5%)	0	1.0
	Ausente	14 (63.6%)	7 (31.8%)	
Muerte	Presente	1 (4.5%)	0	1.00
	Ausente	14 (63.6%)	7 (31.8%)	

GEN *PTEN*

Por su parte para valorar la expresión de este gen se tomo como referencia un valor de 1.6, por arriba de este fue interpretado como sobreexpresión y por de bajo de este como subexpresión, Figura 8. De forman normal existe una expresión del *PTEN* en el endometrio, la cuál se perdie como parte de vía de la carcinogenesis. El 22.7% de los casos mostraron subexpresión, lo cuál fue correlacionada a paramentos de mal pronostico, como es un estadio patologico avanzado. Al contrario los casos que mostraron sobreexpresión (77.3%) se correlacionaron a parametros de buen pronostico como el grado histologico bien y moderamente diferenciado (G1 y G2), asi como estadio patologico temprano (pT1). Tabla 11.

Figura 8. Niveles de expresión del gen *PTEN*.

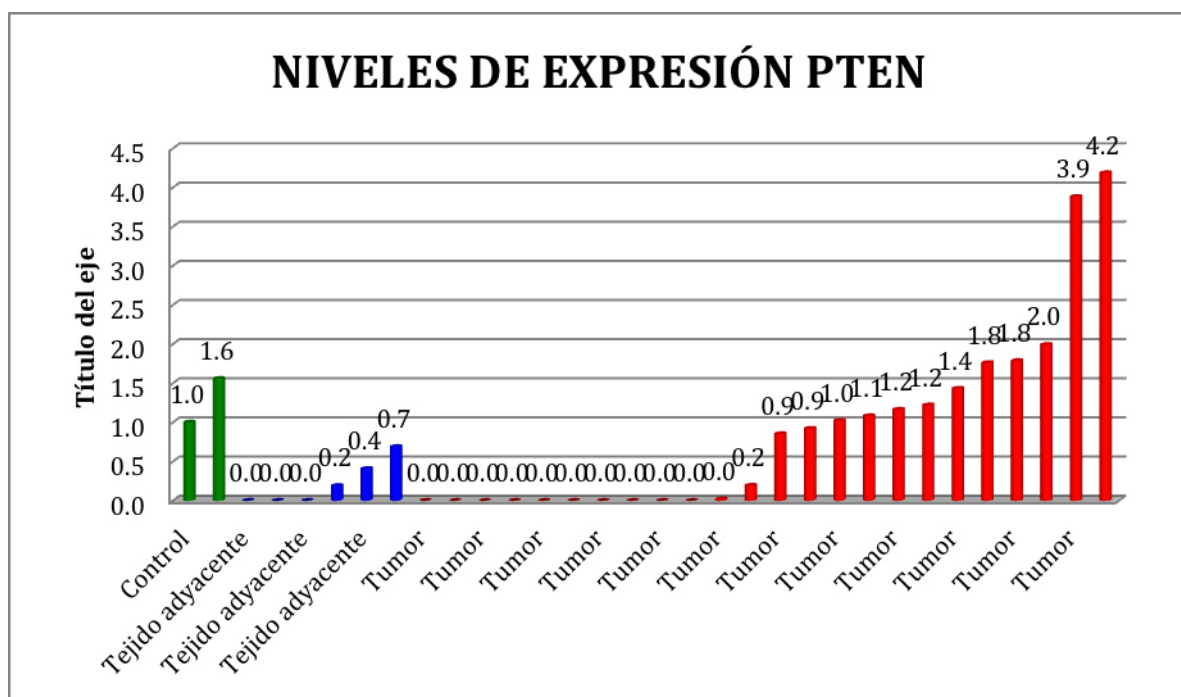


Tabla 11. Asociación a parámetros clínico-patológicos, con la expresión del gen *PTEN*.

Parámetros clínico-patológicos		GEN PTEN		P
		Sobreexpresión	Subexpresión	
Grado Histológico	G1	0	1 (4.5%)	1.0
	G2	7 (31.8%)	7 (31.8%)	
	G3	3 (13.6%)	4 (18.1%)	
Invasión vascular	Presente	6 (27.2%)	11 (50%)	0.13
	Ausente	4 (18.1%)	1 (4.5%)	
Estadio patológico	T1a	5 (22.7%)	5 (22.7%)	1.0
	T1b	4 (18.1%)	6 (27.2%)	
	T2	1 (4.5%)	1	
	T3a	0	0	
Metástasis a GL	Presente	1 (8.3%)	2 (16.6%)	1.0
	Ausente	5 (41.6%)	4 (33.3%)	
Recurrencia	Presente	0	0	N/A
	Ausente	10 (45.4%)	12 (54.5%)	
Muerte	Presente	0	0	N/A
	Ausente	10 (45.4%)	12 (54.5%)	

GEN *PIK3CA*

Se tomo como valor de referencia 1.2, debido a la expresión de los endometrios proliferativos usados como controles. Por arriba de este valor fue interpretado como sobreexpresión y por debajo de este como subexpresión, Figura 9. El 41.6% presentaron sobreexpresión del gen, dichos casos correlacionaron con parámetros de buen pronóstico ya que se presentaron con grados histológicos entre bien y moderadamente diferenciados (G1 y G2), en estadios patológicos tempranos y sin presencia de metástasis ganglionares, a diferencia de los casos que mostraron subexpresión, en los que fueron correlacionados a parámetros de peor comportamiento. Tabla 12.

Figura 9. Niveles de expresión del gen *PIK3CA*.

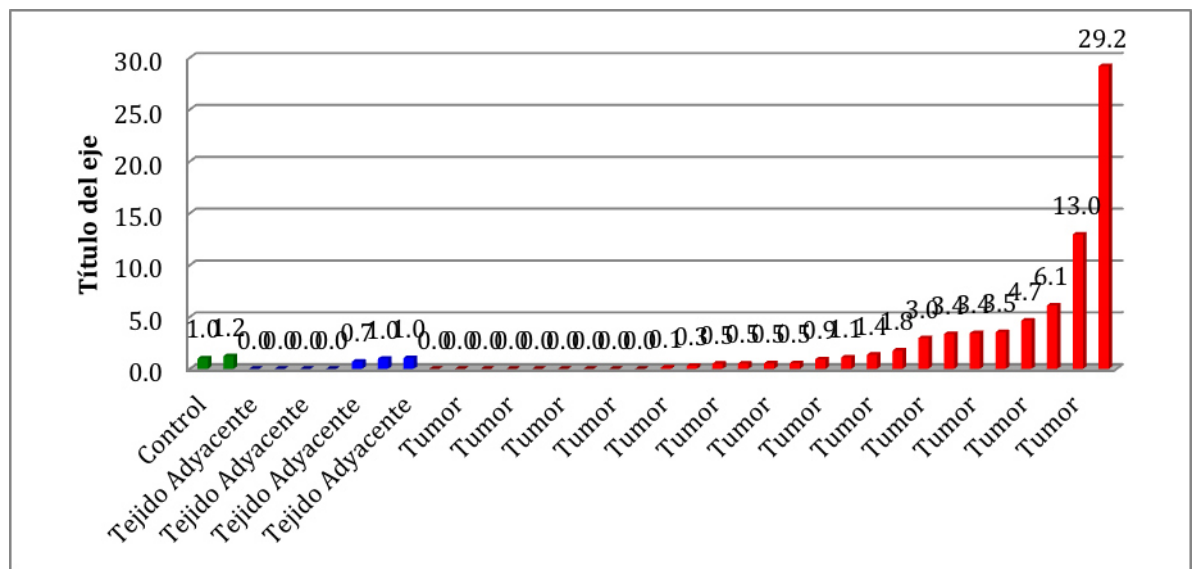


Tabla 12. Asociación a parámetros clínico-patológicos, con la expresión del gen *PIK3CA*.

Parámetros clínico-patológicos		GEN PIK3CA		P
		Sobreexpresión	Subexpresión	
Grado Histológico	G1	1 (4.1%)	0	0.59
	G2	10 (41.6%)	9 (37.5%)	
	G3	1 (4.1%)	3 (12.5%)	
Invasión vascular	Presente	9 (37.5%)	9 (37.5%)	1.0
	Ausente	3 (12.5%)	3 (12.5%)	
Estadio patológico	T1a	8 (33.3%)	5 (20.8%)	0.52
	T1b	3 (12.5%)	5 (20.8%)	
	T2	0	0	
	T3a	1 (4.1%)	2 (8.3%)	
Metástasis a GL	Presente	0	2 (14.2%)	0.46
	Ausente	7 (50%)	5 (35.7%)	
Recurrencia	Presente	1 (4.1%)	2 (8.3%)	1.0
	Ausente	11 (45.8%)	10 (41.6%)	
Muerte	Presente	1 (4.1%)	1 (4.1%)	1.0
	Ausente	11 (45.8%)	11 (45.8%)	

GEN *MKI67*

Se tomo como valor de referencia 2.6, por la expresión de los controles de endometrio secretor, por arriba de este valor fue interpretado como sobrexpresión y por debajo de este como subexpresión. El 100% de los casos mostraron sobrexpresión de este gen, el cuál esta relacionado con la proliferación celular, Figura 10. Existio una correlación del gen *MKI671* con la expresión de la proteína del KI67 por tinciones de inmunohistoquímica, el 55% de los casos mostraron un índice de proliferación alto por inmunotinción, mientras que el 45% restante mostraron un índice de proliferación bajo, lo cual concuerda con los valores de expresión del gen. La correlación con los parametros clínico-patologicos se muestra en la tabla 13.

Figura 10. Niveles de expresión del gen *MKI67*.

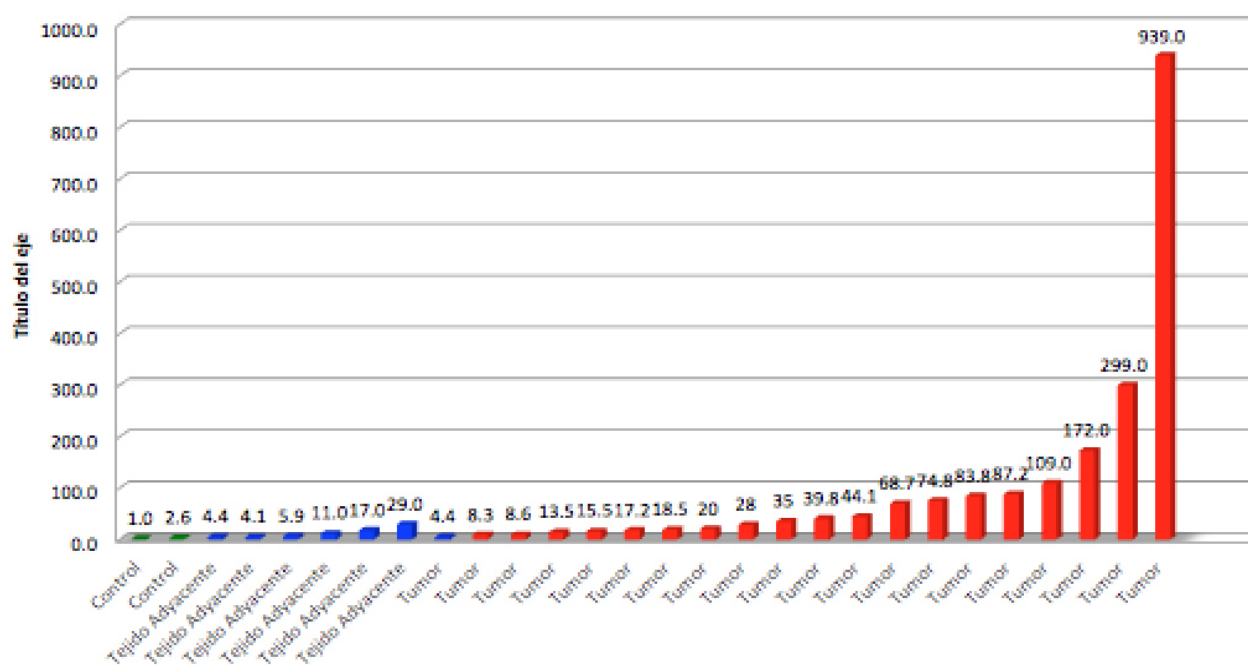


Tabla 13. Asociación a parámetros clínico-patológicos, con la expresión del gen *MKI67*.

Parámetros clínico-patológicos		GEN MKI67
		Sobrexpresión
Grado Histológico	G1	0
	G2	16 (80%)
	G3	4 (20%)
Invasión vascular	Presente	10 (50%)
	Ausente	10 (50%)
Estadio patológico	T1a	10 (50%)
	T1b	5 (25%)
	T2	1 (5%)
	T3a	4 (20%)
Metástasis a GL	Presente	0
	Ausente	10 (100%)
Recurrencia	Presente	0
	Ausente	20 (100%)
Muerte	Presente	0
	Ausente	20 (100%)

CAPÍTULO X

DISCUSIÓN

En este estudio, la mayoría de los casos con carcinoma de endometrio tipo I (83,8%) estaban representados por un grado histológico moderadamente diferenciado (G2), y se diagnosticaron en las primeras etapas pT1a y pT1b (83,7%), coincidiendo con lo reportado en la literatura, donde el grado histológico G2 y el diagnóstico en etapas tempranas son los casos de mayor presentación ²⁸⁻³¹. Esta es una limitación del estudio debido al bajo porcentaje de carcinomas bien y mal diferenciados, así como un bajo número de etapas tardías.

El perfil de expresión génica del carcinoma de endometrio tipo 1, ha sido poco estudiado. Algunos estudios han mostrado por aislado que la sobreexpresión de los genes de las Metaloproteinasas (MMP), en el cáncer endometrial ha sido previamente estudiada; especialmente los tipos MMP 1, 2, 7 y 9, los cuáles han mostrado sobreexpresión y una asociación con un peor pronóstico ^{32,33}. El subtipo 14 se ha correlacionado con una mayor invasión de miometrios y ganglios linfáticos, pero su estudio se ha limitado a un pequeño número de casos ³⁴. Los estudios previos sobre carcinomas de otros órganos como los del tracto biliar, cavidad oral, tiroides y colon, han

demostrado una correlación entre la sobreexpresión de *MMP 11* y un peor pronóstico ³⁵⁻³⁷. En nuestro estudio, los casos que mostraron sobreexpresión de *MMP 11* con valores entre 1,1 y 600 veces los valores normales, se correlacionaron con características histopatológicas favorables como grado nuclear bien y moderadamente diferenciado (G1, G2), estadios temprano, metástasis a ganglios linfáticos solo en el 3.7%, a diferencia a lo publicado en otros órganos en la literatura.

Otros estudios de líneas celulares de cáncer relacionadas con hormonas, como el carcinoma de mama, ovario y próstata, han demostrado una correlación entre la sobreexpresión de las metaloproteinasas (MMP) y el aumento de la proliferación e invasión de células cancerígenas. En nuestro estudio, centrado en el carcinoma endometrial tipo 1 (endometriode y sus variantes), se evaluó la expresión de receptores hormonales (ERα y PR) ²⁴. Así como la expresión del gen *ESR1*, los casos con un alto porcentaje de positividad de los receptores hormonales por inmunotinciones (por encima del 70%), así como la sobreexpresión del gen *ESR1* se asociaron con características histopatológicas menos adversas, cuando se compararon con casos de negatividad o subexpresión de estos receptores ²⁵.

La inactivación del *PTEN* por mutación es la anomalía genética más frecuente en el carcinoma de endometrio tipo 1 (endometriode). Las mutaciones *PTEN* también se han detectado en lesiones endometriales premalignas como la hiperplasia endometrial con atipia. Se sugiere que la

mutación *PTEN* es un hallazgo temprano en el desarrollo de carcinoma endometriode. La base molecular de las mutaciones *PTEN* aún no ha sido completamente entendida. La pérdida de la expresión *PTEN* se ha correlacionado previamente con resultados clínicos favorables y no favorables. Estos resultados contradictorios sugieren cambios en las relaciones entre la inactivación del *PTEN* y otras alteraciones genéticas moleculares parcialmente desconocidas en diferentes estadios clínicos. Risinger et al sugieren que la pérdida de expresión de *PTEN* está asociada con un buen pronóstico (histología endometriode, bajo grado y ausencia de invasión a miometrio), mientras que algunos otros sugieren que la pérdida de expresión de *PTEN* no sólo se asocia con mal pronóstico, sino que puede encontrarse en estadio avanzado ³⁸⁻⁴⁰. En este estudio la inactivación del gen, medida a través de la subexpresión del gen (22.7% de los casos), fue correlacionada a parámetros de mal pronóstico, como es un estadio patológico avanzado, por lo cuál apoya los resultados obtenidos en otros estudios sobre la inactivación del gen y la correlación a parámetros de peor comportamiento, lo cuál tiene lógica, debido a que la expresión y activación del gen está presente en un endometrio sin alteraciones.

La vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT desempeña un papel clave en la regulación de la homeostasis celular. La activación de los receptores de la superficie celular recluta PI3K, que fosforila el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato para generar fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato, reconocido por la proteína quinasa AKT y su regulador PDK1. En la membrana celular, el AKT se

fosforila en residuos de serina y treonina. Activado AKT modula la expresión de varios genes implicados en la supresión de la apoptosis y la progresión del ciclo celular. Además, hay una conversación de señalización entre la vía PI3K/AKT y la vía de señalización RAS-MEKK ⁴¹.

La vía PI3K/AKT, se activa con frecuencia en los carcinomas endometriales, a menudo como resultado de las mutaciones en el gen supresor tumoral *PTEN*. Las mutaciones de *PIK3CA* se detectaron en el 36% de los carcinomas endometriales y con frecuencia coexisten con mutaciones en *PTEN* ⁴².

Se ha informado de que las mutaciones en los exones 1-7 de *PIK3CA* son prevalentes en el cáncer endometrial, y comprenden el 50% de todas las mutaciones identificadas. Catusus et al., 2008, ha demostrado que la presencia de mutaciones *PIK3CA* está correlacionada con varios factores clínico-patológicos de mal pronóstico como son la invasión del miometrio, tumores de alto grado, invasión angiolinfática ⁴³. Otras publicaciones también relacionan los casos con mutación de *PIK3CA* y parámetros clínico-patológicos adversos ⁴⁴. En esta estudio, los casos con subexpresión del gen estuvieron correlacionados a parámetros de peor comportamiento. Tabla 12.

Esto concuerda con los resultados de *PTEN* en nuestro estudio, en donde los casos con subexpresión fueron relacionados a parámetros de mal pronóstico a diferencia de los casos que presentaron sobreexpresión, lo que pudiera estar la vía de activación del *PIK3CA* y sus coexistentes mutaciones con *PTEN*.

El gen *MKi67* es un gen que codifica una proteína nuclear que funciona en la proliferación celular (Ki67). Es usado de rutina mediante tinciones de inmunohistoquímica para medir el índice de proliferación celular, el cuál entre más alto ha sido correlacionado a parámetros clínico-patológicos de mal pronóstico ⁴⁵⁻⁴⁷. En este estudio el índice de proliferación celular fue medido, mediante la expresión del gen *MKi67* por PCR, así como la expresión de la proteína (Ki67) por tinciones de inmunohistoquímica, encontrándose que el 55% de los casos mostraron un índice de proliferación alto por inmunotinción, lo cual concuerda con los valores de expresión del gen, ya que todos los casos mostraron sobreexpresión, pero a distintos niveles, no existieron casos de subexpresión, esto debido a que se trata de casos con carcinomas, es decir tumores malignos que están en replicación constante. Su correlación con los parámetros clínico-patológicos se resume en la tabla 13.

CAPÍTULO XI

CONCLUSIÓN

El perfil de expresión genética de los cinco genes en este estudio (*MMP11*, *ESR1*, *PTEN*, *PIK3CA*, y *MKI67*), correlaciona con lo reportado en la literatura de forma aislada, con los parámetros clínico-patológicos asociados a comportamiento. Estos genes pudieran ser usados mediante una plataforma moléculas para predecir el comportamiento de las pacientes con carcinoma de endometrio tipo 1, y en los casos que se presente mutación del *PIK3CA*, pudieran ser candidatas a terapia blanco, en pacientes con estadios avanzados que ameriten terapia adyuvante.

CAPÍTULO XII

REFERENCIAS

1. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch.* 2004 Mar;444(3):213-23.
2. Liu FS. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2007 Mar;46(1):26-32.
3. Frederic Amant MD, Philippe Moerman MD, Patrick Neven MD, et al. Endometrial Cancer. *The Lancet.* 2005 Aug;366: 491-505.
4. Ruvalcaba-Limón E, Cantú-de León D, León- Rodríguez E, et al. The first Mexican consensus of endometrial cancer. Grupo de Investigación en Cáncer de Ovario y Tumores Ginecológicos de México. *Rev Invest Clin.* 2010 Nov-Dec;62(6):583, 585-605.
5. Dominik Denschlag, Uwe Ulrich, Günter Emons. The Diagnosis and Treatment of Endometrial Cancer. Progress and Controversies. *Dtsch Arztebl Int.* 2011 Aug; 108(34-35): 571–577.
6. Zannoni GF, Vellone VG, Arena V. Does high grade endometrioid carcinoma (grade3 FIGO) belong to type I or type II endometrial cancer? A clinical-pathological and immunohistochemical study. *Virchows Arch.* 2010 Jul;457(1):27-34.
7. Xianrong Ma, Charles X. Ma, Jianghui Wang. Endometrial Carcinogenesis and Molecular Signaling Pathways. *American Journal of Molecular Biology*, 2014, 4, 134-149.

8. Azueta A, Gatus S, Matias-Guiu X. Endometrioid carcinoma of the endometrium: pathologic and molecular features. *Semin Diagn Pathol.* 2010 Nov; 27(4):226-40.

9. Mutter GL, Ince TA, Baak JP, Kust GA, Zhou XP, Eng C. Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium. *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(11):4311-4.

10. George L. Mutter, Ming-Chieh Lin, Jeffrey T. Fitzgerald, Jennifer B. Kum, Jan P. A. Baak, Jacqueline A. Lees, Liang-Ping Weng, Charis Eng. Altered PTEN Expression as a Diagnostic Marker for the Earliest Endometrial Precancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2000 92(11):924-930.

11. Sun H, Enomoto T, Shroyer KR, Ozaki K, Fujita M, Ueda Y, Nakashima R, Kuragaki C, Ueda G, Murata Y. Clonal analysis and mutations in the PTEN and the K-ras genes in endometrial hyperplasia. *Diagn Mol Pathol.* 2002 Dec;11(4):204-11.

12. Sasaki H, Nishii H, Takahashi H, Tada A, Furusato M, Terashima Y, Siegal GP, Parker SL, Kohler MF, Berchuck A, et al. Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer Res.* 1993 Apr 15;53(8):1906-10.

13. Ozuysal S, Oztürk H, Bilgin T, Filiz G. Expression of cyclin D1 in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium and its correlation with Ki-67 and clinicopathological variables. *Arch Gynecol Obstet.* 2005 Feb;271(2):123-6.

14. Terlikowski S, Lenczewski A, Famulski W, Sulkowska M, Dobrzycka B, Stasiuk-Barmuta A, Kulikowski M. Patterns of Immunohistochemical staining for p53 expression in hyperplastic endometrium and adenocarcinoma. *Folia Histochem Cytobiol.* 2001;39 Suppl 2:195-6.

15. Inaba F, Kawamata H, Teramoto T, Fukasawa I, Inaba N, Fujimori T. PTEN and p53 abnormalities are indicative and predictive factors for endometrial carcinoma. *Oncol Rep.* 2005 Jan;13(1):17-24.

16. Saegusa M, Hashimura M, Yoshida T, Okayasu I. beta- Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2001 Jan;84(2):209-17.
17. Peter W Schlosshauer M.D., Lora Hedrick Ellenson M.D. and Robert A Soslow M.D. b-Catenin and E-Cadherin Expression Patterns in High-Grade Endometrial Carcinoma Are Associated with Histological Subtype. *Mod Pathol* 2002;15(10):1032–1037.
18. Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, Järvinen H, Lynch HT. The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med*. 1994 Jun;96(6):516-20.
19. Kanaya T, Kyo S, Sakaguchi J, Maida Y, Nakamura M, Takakura M, Hashimoto M, Mizumoto Y, Inoue M. Association of mismatch repair deficiency with PTEN frameshift mutations in endometrial cancers and the precursors in a Japanese population. *Am J Clin Pathol*. 2005 Jul;124(1):89-96.
20. Spurdle AB, Bowman MA, Shamsani J, et al. Endometrial cancer gene panels: clinical diagnostic vs research germline DNA testing. *Mod Pathol*. 2017 Apr 28.
21. Cherniack AD, Shen H, Walter V, et al. Integrated Molecular Characterization of Uterine Carcinosarcoma. *Cancer Cell*. 2017 Mar 13;31(3):411-423.
22. Christos Sotiriou, M.D., D.Phil., Lajos Pusztai, M.D., D.Phil. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:790-800.

23. Balázs Györfy, Christos Hatzis, Tara Sanft. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Research* 2015;17:11

24. Stoian SC, Simionescu C, Mărgăritescu C, Stepan A, Nurciu M. Endometrial carcinomas: correlation between ER, PR, Ki67 status and histopathological prognostic parameters. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(2):631-6.

25. Gottwald L, Kubiak R, Sek P, Piekarski J. The value of Ki-67 antigen expression in tissue microarray method in prediction prognosis of patients with endometrioid endometrial cancer *Ginek Pol*. 2013 Jun; 84(6): 444-9.

26. Urabe R, Hachisuga T, Kurita T, Kagami S, Kawagoe T, Prognostic significance of overexpression of p53 in uterine endometrioid adenocarcinomas with an analysis of nuclear grade. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014 Mar; 40(3): 812-9.

27. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013 May 2; 497(7447): 67-73.

28. Sanci M, Güngördük K, Gülseren V, et al. MELF Pattern for Predicting Lymph Node Involvement and Survival in Grade I-II Endometrioid-type Endometrium Cancer. *Int J Gynecol Pathol*. 2017 Mar 17.

29. Mariani A, Dowdy SC, Cliby WA, et al. Prospective assessment of lymphatic dissemination in endometrial cancer: a paradigm shift in surgical staging. *Gynecol Oncol*. 2008 Apr;109(1): 11-8.

- 30.Yldirim ME, Karakus S, Kurtulgan HK. The Association of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) Level and PAI-1 4G/5G Gene Polymorphism with the Formation and the Grade of Endometrial Cancer. *Biochem Genet.* 2017 Mar 16.

- 31.Roma AA, Rybicki LA, Barbuto D, et al. Risk factor analysis of recurrence in low-grade endometrial adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2015 Oct;46 (10):1529-39.

- 32.Yan, C. & Boyd, D. D. Metalloproteinase gene expression. *J. Cell Physiol.* 2007. 211: 19-26.

- 33.Obokata A, Watanabe J, Nishimura Y, et al. Significance of matrix metalloproteinase-7 [correction of matrix metalloproteinase-2], -11 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Anticancer Res.* 2007 Jan-Feb; 27(1A): 95-105.

- 34.Graesslin O, Cortez A, Fauvet R, et al. Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study. *Ann Oncol.* 2006; 17: 637–45.

35. Tongtawee T, Kaewpitoon SJ, Loyd R, et al. High Expression of Matrix Metalloproteinase-11 indicates Poor Prognosis in Human Cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16: 3697-701.

- 36.Hsin CH, Chen MK, Tang CH, et al. High level of plasma matrix metalloproteinase-11 is associated with clinic pathological characteristics in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2014; 9:e113129.

37. Xu CJ, Xu F. MMP-11 and VEGF-C expression correlate with clinical features of colorectal adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7:2883-8.
38. Kimura F, Watanabe J, Hata H, et al. PTEN immunohistochemical expression is suppressed in G1 endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004;130:161Y168.
39. Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, et al. PTEN expression is associated with prognosis for patients with advanced endometrial carcinoma undergoing postoperative chemotherapy. *Int J Cancer*. 2002;100:686Y689.
40. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, et al. PTEN mutation in endometrial cancer is associated with favourable clinical and pathological characteristics. *Clin Cancer Res*. 1998; 4:3005Y3010.
41. Leslie NR, Downes CP. PTEN: the down side of PI3 kinase signalling. *Cell Signal* 2002;14:285 - 95.
42. Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, et al. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:892 - 5.
43. Catusus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J. PIK3CA mutations in the kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with adverse prognostic parameters. *Mod Pathol* 2008;21:131–9.

44. Catasus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J. Concomitant PI3K-AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis. *Mod Pathol* 2009;22:522–9.
45. Fanning J, Brown S, Phibbs G, et al. Immunohistochemical evaluation is not prognostic for recurrence in fully staged high-risk endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12:286–289.
46. Geisler JP, Geisler HE, Miller GA, et al. MIB-1 in endometrial carcinoma: prognostic significance with 5-year follow-up. *Gynecol Oncol* 1999;75: 432–436.
47. Liu T, Gao H, Yang M, et al. Correlation of TNFAIP8 overexpression with the proliferation, metastasis, and disease-free survival in endometrial cancer. *Tumour Biol* 2014;35:5805–5814.

CAPÍTULO XIII

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Gabriela Sofía Gómez Macías

Candidata para el grado de

Doctor en Medicina

Tesis: PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICA EN CÁNCER ENDOMETRIAL TIPO I, PREDICTIVO DE COMPORTAMIENTO TUMORAL

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Educación posgrado: Especialidad de Anatomía Patológica en el Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la UANL.

Observership en la sección de patología del *National Cancer Institute NCI/NHI*, Bethesda Maryland en las áreas de Ginecopatología, Patología mamaria y biología molecular.

Fellowship en patología ginecologica y mamaria *el National Institute of Health/ National Cancer Institute, NHI/NCI*, Bethesda Maryland, USA.

Observership en la sección de Ginecopatología en el laboratorio de Patología del *MD Anderson Cancer Center*, de la Universidad de Texas, USA.

Experiencia Profesional: Profesor de tiempo completo, Facultad de Medicina de la Universidad Autonoma de Nuevo León (UANL).

Profesor de posgrado en las áreas de Ginecopatología y Citopatología, de la especialidad de Anatomía patológica del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la UANL.

Patólogo del Centro del Cáncer de Mama del Hospital San José, Zambrano-Hellion del ITESM.

Miembro del sistema nacional de investigadores (SNI) nivel 1.

CAPÍTULO XIV

CARTA DE ACEPTACIÓN (Revista para publicación)

SPANDIDOS PUBLICATIONS UK LTD

5-6 Kings Street Cloisters

Clifton Walk

London W6 0GY

Tel +44 (0)20 7262 8050

Fax +44 (0)20 7262 9825

Registered Number 7341997 England

Pedro de Alba y Manuel L. Barragan. Ciudad Universitaria. San Nicolas de los Garza,
Nuevo Leon,
Mexico

May 18, 2017

Our reference: 180280

Journal: Oncology Letters

Title: Expression of the Matrix Metalloproteinase 11 (MMP11) Gene in Type 1 Endometrial Cancer

Authors: Dr Gabriela Sofía Gómez-Macías, Dr María de Lourdes Garza-Rodríguez, Dr Raquel Garza-Guajardo, Dr Daniela Monsiváis-Ovalle, Dr Jesús Ancer-Rodríguez, Dr Hugo Alberto Barrera-Saldaña, Dr Oralia Barboza-Quintana

Dear María Marisela Sánchez-Chaparro,

Thank you for your submission. The manuscript 'Expression of the Matrix Metalloproteinase 11 (MMP11) Gene in Type 1 Endometrial Cancer' by Gómez-Macías et al was provisionally accepted for publication in Oncology Letters on May 17, 2017. The submission should be considered to be formally accepted upon the receipt of proofs.

An author PDF file will be provided on publication.

Yours Sincerely,

Demetrios A. Spandidos

SPANDIDOS PUBLICATIONS UK LTD
5-6 KING STREET CLOISTERS
LONDON, W6 0GY, UNITED KINGDOM
VAT: 996278548
TEL: +442072628050 FAX: +442072629825